The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスによる低酸素誘導因子HIF-1α発現量低下誘導機構の解明に関する検討
Author(s)	寶谷, 拓磨
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72310
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　寶谷　拓磨　　）	
論文題名	腫瘍溶解性ウイルスであるレオウイルスによる低酸素誘導因子HIF-1α 発現量低下誘導機構の解明に関する検討

論文内容の要旨

近年、新規抗がん剤として、腫瘍細胞特異的に増殖し、細胞死を誘導する腫瘍溶解性ウイルスに大きな注目が集まっている。これまでに10種を超える腫瘍溶解性ウイルスが開発されているが、なかでも1.2~3.9kbの10本の二本鎖RNAをゲノムとして有するレオウイルスは、遺伝子改変をせずとも、野生型のウイルスが腫瘍細胞特異的な感染増殖を示すこと、成人に対して病原性を示さないこと、静脈内投与可能であることなど、他の腫瘍溶解性ウイルスと異なる特長を有していることから大きな期待が寄せられている。既に欧米では、20以上の臨床プロトコルが進行中であるとともに、転移性乳がんに対するパクリタキセルとの併用治療は、米国FDAのFast Trackに指定されている。

レオウイルスによる抗腫瘍効果の主なメカニズムとしては、ウイルスの感染増殖による腫瘍細胞の細胞死誘導であるが、それに加えて近年、レオウイルスが様々な機構を介して抗腫瘍効果を誘導していることが明らかとなってきた。その一つとして、レオウイルスが低酸素誘導因子Hypoxia inducible factor-1α（HIF-1α）の発現量を低下させることが明らかになった。腫瘍微小環境において発現が亢進しているHIF-1αは、Vascular Endothelial Growth Factor（VEGF）やGlucose Transporter-1（Glut1）など様々な標的遺伝子の発現を誘導することで、低酸素環境下における腫瘍細胞の生存増殖を支持するだけでなく、血管新生や腫瘍細胞の転移浸潤を促すことで腫瘍の増悪化を促進することが知られている。従って、レオウイルスはHIF-1αの発現量低下を誘導することで、腫瘍の増殖及び増悪化を抑制していることが予想される。しかしながら、感染したレオウイルスが、どのようなメカニズムにより、HIF-1αの発現量低下を誘導するかは明らかになっていない。また、レオウイルスがHIF-1αの発現量低下を誘導することは、培養細胞を用いた検討でしか明らかにされておらず、生体においても同様の現象が観察されるかは明らかにされていない。レオウイルスによるHIF-1α発現量低下誘導メカニズムの解明は、レオウイルスの抗腫瘍効果の更なる向上や併用療法時の適切な抗がん剤の選択のみならず、新規創薬標的の同定などに繋がることから、がん治療の発展に大きく貢献するものと期待される。そこで本研究では、レオウイルスによるHIF-1α発現量低下誘導メカニズムの解明を目指して、マウス皮下腫瘍においてもレオウイルス投与によりHIF-1αの発現量低下が誘導されるか検討を行うとともに、培養細胞を用いてそのメカニズムの解明を試みた。

まず、ヒト腫瘍細胞株を移植した担がんマウスにレオウイルスを静脈内投与することで、マウス腫瘍においてもレオウイルスがHIF-1αの発現量を低下させるか検討を行った。レオウイルス静脈内投与後のHIF-1αの発現量の変化を経時的に観察するために、HIF-1α依存的にルシフェラーゼを発現するヒト腫瘍細胞株を作製し、それをヌードマウスの皮下へ移植した。作製した担がんマウスにレオウイルスを静脈内投与し、*in vivo* imaging解析により、経時的にルシフェラーゼの発現を評価した。その結果、レオウイルス静脈内投与120時間後に有意なルシフェラーゼ遺伝子の発現量低下が観察された。さらに、レオウイルス静脈内投与120時間後に腫瘍組織を回収し、定量的RT-PCRやWestern blotting、免疫染色により解析を行った。その結果、静脈内投与120時間後に低酸素領域を含む腫瘍組織でレオウイルスの外殻タンパク質の発現が検出されるとともに、顕著なHIF-1αの発現量の低下と、それに伴うHIF-1α標的遺伝子の発現量の低下が観察された。なお、この時点において、腫瘍細胞の顕著な細胞死は観察されず、また低酸素領域を示すピモニダゾール陽性細胞数にも大きな変化は観察されなかった。一方で、レオウイルスによるHIF-1αの発現量低下は、UV照射により感染能を欠失させたレオウイルスでは観察されなかった。以上の結果より、静脈内投与されたレオウイルスは、腫瘍組織内にて感染・増殖し、低酸素領域の腫瘍細胞にも感染することで、HIF-1αならびにその標的遺伝子の発現量低下を誘導することが明らかになった。

次に、ヒト腫瘍細胞株を用いて、レオウイルスがHIF-1αの発現量を低下させるメカニズムの解析を試みた。レオウイルスは、10本の二本鎖RNAをゲノムとして有することから、HIF-1α発現量の低下にウイルスゲノムが関与しているのではないかと考え、検討を行った。ウイルス粒子よりゲノムRNAを回収し、各種培養細胞にTransfectionしたところ、顕著なHIF-1αの発現量の低下が観察された。同様に、合成二本鎖RNAアナログであるpolyI:CをTransfectionした場合においても、HIF-1α発現量が大きく低下した。従って、二本鎖RNAがHIF-1αの発現量低下に重要であることが示された。

そこで次に、二本鎖RNAを認識することでHIF-1αの発現量低下を誘導する宿主側の分子の同定を試みた。その結果、Double-stranded RNA-dependent Protein kinase R（PKR）が、HIF-1αの発現量低下の誘導に重要であることが明らかになった。さらに、プロテアソーム阻害剤を用いた検討により、レオウイルスによるHIF-1α発現量低下の誘導は、プロテアソームによるHIF-1αの分解の亢進によるものであることが明らかになった。以上の結果より、二本鎖RNAであるレオウイルスゲノムが宿主のPKRに認識されることで、プロテアソームによるHIF-1αの分解が促進されることが明らかとなった。さらに、レオウイルスが、HIF-1α以外にも、種々のタンパク質の分解を促進するのではないかと考え、検討を行った。その結果、二本鎖RNAを認識して活性化したPKRは、HIF-1αのみならず、Cyclin-dependent kinase 4（CDK4）やHER2など、がんの増悪化に関与する複数のタンパク質のプロテアソーム依存的な分解も促進することを明らかにした。

以上、本研究では、レオウイルスが静脈内投与後、培養細胞のみならずマウス皮下腫瘍においても、HIF-1α並びにHIF-1α標的遺伝子の発現量を低下させることを明らかにした。さらに、ヒト腫瘍細胞株を用いた検討から、レオウイルスのゲノムRNAが宿主のPKRに認識されることで、HIF-1αを含む複数のがんの増悪化に関与するタンパク質のプロテアソーム依存的な分解を誘導することが明らかになった。本研究が、レオウイルスを用いたがん治療だけでなく、二本鎖RNAを用いた治療方法のさらなる発展に寄与することを期待したい。

様式7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　寶谷　拓磨　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	水口　裕之
	副 査　教 授	土井　健史
	副 査　教 授	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

近年、新規抗がん剤として、腫瘍細胞特異的に増殖し、細胞死を誘導する腫瘍溶解性ウイルスに大きな注目が集まっている。これまでに10種を超える腫瘍溶解性ウイルスが開発されているが、なかでも10本の二本鎖RNAをゲノムとして有するレオウイルスは、遺伝子改変をせずとも、野生型のウイルスが腫瘍細胞特異的な感染増殖を示すこと、成人に対して病原性を示さないこと、静脈内投与可能であることなど、他の腫瘍溶解性ウイルスと異なる特長を有していることから大きな期待が寄せられている。既に欧米では、20以上の臨床プロトコルが進行中であるとともに、転移性乳がんに対するパクリタキセルとの併用治療は、米国FDAのFast Trackに指定されている。

レオウイルスによる抗腫瘍効果の主なメカニズムとしては、ウイルスの感染増殖による腫瘍細胞の細胞死誘導であるが、それに加えて近年、レオウイルスが様々な機構を介して抗腫瘍効果を誘導していることが明らかとなってきた。その一つとして、レオウイルスが低酸素誘導因子Hypoxia inducible factor-1α（HIF-1α）の発現量を低下させることが明らかになった。腫瘍微小環境において発現が亢進しているHIF-1αは、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)など様々な標的遺伝子の発現を誘導することで、腫瘍の増悪化を促進することが知られている。従って、レオウイルスはHIF-1αの発現量低下を誘導することで、腫瘍の増殖及び増悪化を抑制していることが予想される。しかしながら、感染したレオウイルスが、どのようなメカニズムにより、HIF-1αの発現量低下を誘導するかは明らかになっていない。また、レオウイルスがHIF-1αの発現量低下を誘導することは、培養細胞を用いた検討でしか明らかにされておらず、生体においても同様の現象が観察されるかは明らかにされていない。レオウイルスによるHIF-1α発現量低下誘導メカニズムの解明は、レオウイルスの抗腫瘍効果の更なる向上や併用療法時の適切な抗がん剤の選択のみならず、新規創薬標的の同定などに繋がることから、がん治療の発展に大きく貢献するものと期待される。そこで本研究では、レオウイルスによるHIF-1α発現低下誘導メカニズムの解明を目指して、マウス皮下腫瘍においてもレオウイルス投与によりHIF-1αの発現量低下が誘導されるか検討を行うとともに、培養細胞を用いてそのメカニズムの解明を試みた。本検討により以下の結果を得た。

1. レオウイルスは、培養細胞のみならず、マウス皮下腫瘍においても HIF-1α並びに HIF-1α標的遺伝子の発現量低下を誘導することを示した。
2. 細胞内でレオウイルスゲノムなどの長鎖の二本鎖 RNA を認識した PKR が活性化することで、プロテアソーム依存的な HIF-1αの発現量低下が促進されることを示した。
3. 二本鎖 RNA を認識して活性化した PKR は、HIF-1αのみならず、がんの増悪化に関与する複数のタンパク質のプロテアソーム依存的な発現量低下を誘導することを示した。

以上、本論文では、レオウイルスによるHIF-1a発現量低下の抗腫瘍効果への寄与、並びに誘導メカニズムの一端を明らかにした。今回得られた結果から、二本鎖RNAがHIF-1aのみならず、複数のタンパク質の発現量低下を介して相乗的に抗腫瘍効果を示す可能性が示唆され、がん治療における二本鎖RNAの新たな活用方法に繋がる知見を得た。したがって本成果は、レオウイルスを用いたがん治療のみならず、二本鎖RNAを用いた治療に有用な知見を提供するものであり、本論文は極めて意義深く、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。